昆 虫 学 报 Acta Entomologica Sinica，June 2004，47(3)：305 - 309　　ISSN 0454-6296

菜青虫不同虫态及虫龄的多酚氧化酶性质比较

薛超彬[1]，陈清西[2]，王　勤[2]，柯莉娜[2]，罗万春[1*]

（1. 山东农业大学植物保护学院，农药毒理与应用技术省级重点实验室，山东泰安　271018；
2. 厦门大学生命科学学院教育部细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室，福建厦门　361005）

摘要：初步比较了菜青虫 *Pieris rapae*（L.）不同虫态及虫龄的多酚氧化酶（polyphenoloxidase）的性质。结果表明，不同虫态及虫龄的多酚氧化酶活力有很大的不同，其中以 5 龄幼虫酶活力最高，蛹酶活力最低。酶活力大小依次为：5 龄幼虫 > 预蛹 > 4 龄幼虫 > 3 龄幼虫 > 蛹。以邻苯二酚为底物，研究了 pH 对多酚氧化酶活力的影响，结果表明酶催化底物氧化均有一个最适 pH 区域，不同虫态及虫龄的多酚氧化酶最适 pH 基本相同，其值为 7.0 ± 0.2。不同虫态及虫龄的多酚氧化酶催化底物氧化的最适温度有很大的差异。3 龄、4 龄、5 龄幼虫、预蛹和蛹的多酚氧化酶活力的最适温度分别为 36.0 ± 0.5℃、38.5 ± 1.0℃、43.0 ± 1.0℃、45.5 ± 1.0℃和 50.0 ± 1.5℃，说明蛹期的多酚氧化酶活力的最适温度较高。进一步比较催化底物氧化反应的活化能，测得 3 龄、4 龄、5 龄幼虫、预蛹和蛹的多酚氧化酶活化能分别为：43.10 ± 0.28、36.50 ± 0.27、25.79 ± 0.32、30.10 ± 0.21 和 58.88 ± 0.39 kJ/mol。通过测定不同虫态及虫龄的多酚氧化酶催化邻苯二酚和 L-多巴氧化反应的动力学特征参数，比较了不同虫期的酶对底物的亲和力。

关键词：菜青虫；多酚氧化酶；酶活力；动力学性质

中图分类号：Q965.9　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2004)03-0305-05

Comparison on properties of polyphenoloxidase from *Pieris rapae*（L.）in different stages and instars

XUE Chao-Bin[1]，CHEN Qing-Xi[2]，WANG Qin[2]，KE Li-Na[2]，LUO Wan-Chun[1*]（1. College of Plant Protection，Key Laboratory of Pesticide Toxicology and Application Technique，Shandong Agricultural University，Taian，Shandong 271018，China；2. Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering，College of Life Sciences，Xiamen University，Xiamen，Fujian 361005，China）

Abstract: The kinetic properties of polyphenoloxidase（PPO）from *Pieris rapae*（L.）in different stages and instars were studied and compared. The results showed that the polyphenoloxidase activity was different at different stages and instars in this insect. The enzyme activity of the 5th instar was the highest and that of the pupa was the lowest. The order of the enzyme activity was the 5th instar > prepupa > the 4th instar > the 3rd instar > pupa. The effect of pH on the activity of polyphenoloxidase was studied，and the results showed that the optimum pH was the same value in all of the stages and instars and the best pH value for the oxidation of catechol was 7.0 ± 0.2. The optimum temperature of the polyphenoloxidase activity was very variable in the tested stages and instars of the insect. The optimum temperature for the 3rd instar，4th instar，5th instar，prepupa and pupa was 36.0 ± 0.5℃，38.5 ± 1.0℃，43.0 ± 1.0℃，45.5 ± 1.0℃ and 50.0 ± 1.5℃，respectively，indicating that the optimum temperature of the pupa was the highest. The activation energy of the enzyme from this insect for the oxidation of catechol was 43.10 ± 0.28，36.50 ± 0.27，25.79 ± 0.32，30.10 ± 0.21 and 58.88 ± 0.39 kJ/mol for the 3rd instar，4th instar，5th instar，prepupa and pupa，respectively. The kinetic parameters for the oxidation of catechol and L-DOPA by polyphenoloxidase from the different stages and instars were determined and compared.

Key words: *Pieris rapae*；polyphenoloxidase；enzyme activity；kinetic properties

---

基金项目：国家自然科学基金项目（30270887）；博士后科学基金项目
作者简介：薛超彬，男，1978 年生，山东东平人，农药毒理与环境友好农药硕士研究生，E-mail：cbxue12@163.com
* 通讯作者 Author for correspondence，Tel.：(0538)8242983；E-mail：wcluo@sdau.edu.cn
收稿日期 Received：2003-06-26；接受日期 Accepted：2003-10-08

多酚氧化酶(polyphenoloxidase,PPO,EC1.14.18.1)广泛存在于生物体内。它是昆虫体内的一种重要酶类,在昆虫的变态发育和免疫系统中起着重要作用(Ashida and Yamazaki,1990; Boman *et al*.,1991)。它具有单酚酶活性和二酚酶活性,能将酪氨酸羟化,产生邻位二羟基苯丙氨酸(L-多巴),然后再将多巴氧化成多巴醌,进而生成一系列引起褐化的色素类物质。昆虫中最常见的鞣化是醌鞣化,其中包括O-醌与表皮蛋白的自由氨基成键结合(王荫长,2001)。酚氧化酶催化完成的这种醌鞣化作用可以促进昆虫表皮的硬化与黑化,这个过程对于具外骨骼的昆虫生命过程至关重要。昆虫成虫刚羽化时表皮是柔软、色淡的,后来经过硬化和黑化过程才得以坚硬。张宗炳和冷欣夫(1993)指出,探索新杀虫药剂的一条最有希望的途径是生物合理途径,其中原酪氨酸酶抑制剂和鞣化过程抑制剂被列在第一、二位。深入研究多酚氧化酶的生化特性,了解多酚氧化酶的作用机理,对发展作用机制独特的新型环境友好杀虫剂具有重要的理论及现实意义。

菜粉蝶 *Pieris rapae* (L.)属鳞翅目粉蝶科,幼虫称为菜青虫,为世界性重要害虫,广泛分布于我国南北各省,为害多种十字花科蔬菜,除了直接取食蔬菜叶片外,又常由于其加害造成的伤口,便于病菌侵入,成为软腐病发生的诱因。在防治该害虫上,一般采用化学防治方法,但农药残留常常对人体和环境造成危害。因此,发展对人体安全、对昆虫具专化作用的杀虫剂用于菜青虫的防治尤为重要。我们试图以与昆虫体壁发生有密切相关的多酚氧化酶为靶标,研究和比较菜青虫不同虫态及虫龄多酚氧化酶的动力学性质,旨在为开发以该酶为靶标的新型害虫控制剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

从福建厦门市集美区后溪镇菜园采集菜青虫,在室内大量饲养。取3龄、4龄、5龄幼虫和预蛹及化蛹后第2天蛹(2日蛹)作为实验材料。所用酶的底物邻苯二酚和L-多巴(L-DOPA)为Sigma公司产品,其他试剂均为国产分析纯或化学纯。

1.2 酶液制备

取3龄、4龄、5龄幼虫、预蛹和2日蛹按5倍体重的比例加入预冷的0.2 mol/L Na_2HPO_4-NaH_2PO_4缓冲液(pH 6.80),冰浴匀浆,冰箱4 ℃静置30 min,4℃,8 000 r/min离心30 min,获得上清液作为酶活力分析样品。

1.3 酶活力测定方法

参照Benjamin和Montgomery(1973)的方法并略有改进。采用磷酸钠盐缓冲体系,在2 mL的测活体系中包含终浓度为0.1 mol/L Na_2HPO_4-NaH_2PO_4缓冲液(pH 6.80),4 mmol/L邻苯二酚,加入30 μL酶液,监测420 nm下光密度值随时间的增长直线,从直线斜率求得酶活力。实验在37℃恒温下进行,使用仪器为Beckman DU 650分光光度计。酶活力单位(U)定义为以每分钟催化底物氧化增加OD值为1.000的酶量。虫和蛹的多酚氧化酶酶量以每克体重所含的酶活力单位数(U/g)表示。各实验均重复3次,每次重复制备酶液。

1.4 pH对酶活力的影响

在37℃恒温下,改变缓冲液的pH,按酶活力测定方法测定不同pH对酶活力的影响。观察不同虫态及虫龄的酶活力随pH的变化趋势。

1.5 温度对酶活力的影响

在pH 6.80的测活体系中,改变测活体系温度,按1.3节的酶活力测定方法测定不同温度对酶活力的影响。比较不同虫态及虫龄酶活力的差异。

1.6 活化能测定

按张喆等(1999)方法测定。在pH 6.80的测活体系中,改变底物浓度,测定酶促反应的初速度(v_0),按Lineweaver-Burk双倒数作图,求出酶促反应的最大速度(V_m)。测定温度对酶促反应的V_m的影响,结果根据Arrhenius公式,以最大反应速度之对数($\lg V_m$)对$1/T$作图,得直线关系,从直线斜率求出酶催化反应的活化能(E_a)。

1.7 底物专一性及动力学特征参数测定

分别以邻苯二酚(3.35~20.0 mmol/L)和L-多巴(0.4~2.0 mmol/L)为底物,在420 nm和475 nm(Chen and Kubo,2002)下测定酶活力,并用Lineweaver-Burk双倒数作图,求出动力学特征参数。

2 结果

2.1 菜青虫不同虫态及虫龄多酚氧化酶活力

分别测定菜青虫的不同虫态及虫龄的多酚氧化酶活力,测得3龄、4龄、5龄幼虫、预蛹和2日蛹的多酚氧化酶含量(U/g)分别为9.83±0.24、10.96±0.27、22.57±0.35、12.53±0.28和8.36±0.14。结

果表明(图 1)：菜青虫不同虫态及虫龄多酚氧化酶的活力有很大的不同，以 5 龄幼虫的活力最高，蛹期的活力最低。在幼虫期，酶活力呈现随幼虫龄期增加而增高的趋势，5 龄幼虫酶活力达最高；而在蛹期酶活力呈下降趋势。

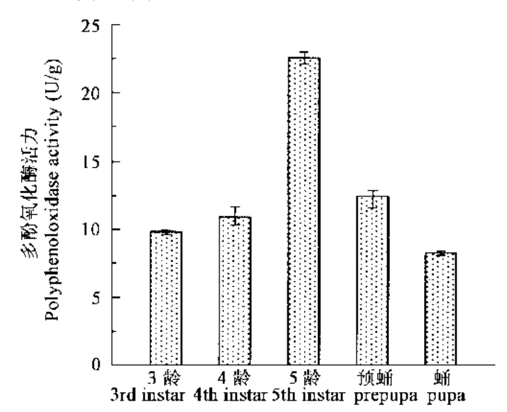


图 1　菜青虫不同虫态及虫龄多酚氧化酶活力比较

Fig. 1　The polyphenoloxidase activity of different stages and instars of *Pieris rapae*

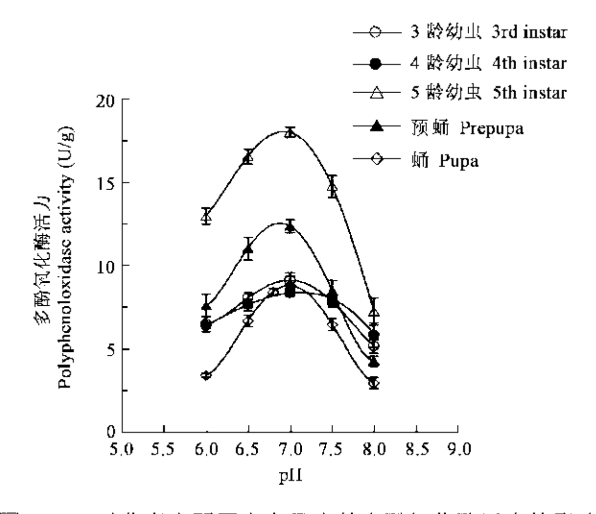


图 2　pH 对菜青虫不同虫态及虫龄多酚氧化酶活力的影响

Fig. 2　Effect of pH on the activity of polyphenoloxidase from different stages and instars of *Pieris rapae*

2.2　pH 对不同虫态及虫龄多酚氧化酶活力的影响及最适 pH

测定 pH 对菜青虫不同虫态及虫龄多酚氧化酶活力的影响，结果表明(图 2)：pH 对酶活力的效应均为钟罩形曲线，表明酶催化底物氧化均有一个最适 pH 区域，pH 对不同虫态及虫龄多酚氧化酶的影响并无明显的差别，最适 pH 为 7.0 ± 0.2。但从 pH 影响酶活性曲线的趋势来看，5 龄幼虫受 pH 影响酶活力变化幅度较大，3 龄幼虫和 4 龄幼虫的酶活力变化曲线则相对平缓。

2.3　温度对不同虫态及虫龄多酚氧化酶活力影响及最适温度

温度对菜青虫不同虫态及虫龄多酚氧化酶活力影响结果见图 3。不同虫期的多酚氧化酶催化底物氧化的最适温度有很大的差异。最适温度随幼虫龄期的增加而增大，蛹态最高。3 龄、4 龄、5 龄幼虫、预蛹和蛹多酚氧化酶活力的最适温度分别为 36.0 ± 0.5℃、38.5 ± 1.0℃、43.0 ± 1.0℃、45.5 ± 1.0℃和 50.0 ± 1.5℃。

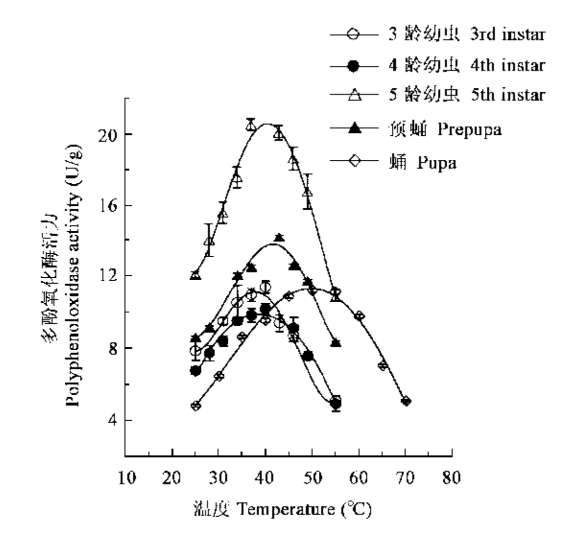


图 3　温度对菜青虫不同虫态及虫龄多酚氧化酶活力的影响

Fig. 3　Effect of temperature on the activity of polyphenoloxidase from different stages and instars of *Pieris rapae*

2.4　不同虫态及虫龄多酚氧化酶的活化能

在测活体系中，改变底物浓度，测定酶促反应的初速度，按 Lineweaver-Burk 双倒数作图，求出酶促反应的最大速度(V_m)。在不同温度下，测定酶促反应的 V_m 值，以 $\lg V_m$ 对 $1/T$ 作图，得直线关系，结果见图 4。多酚氧化酶催化邻苯二酚反应的活化能(E_a)列于表 1。结果表明，不同虫态及虫龄的多酚氧化酶活化能间有较大的差异，以 5 龄幼虫的酶活化能最低，蛹期的最高。

2.5　多酚氧化酶底物专一性及动力学特征参数

分别以邻苯二酚和 L-多巴为底物，测定酶催化反应的动力学。图 5(A)和图 5(B)分别表示 5 龄幼虫多酚氧化酶催化底物邻苯二酚和 L-多巴氧化反应的 Lineweaver-Burk 双倒数图，内插图为初速度(v_0)与底物浓度的关系。结果表明酶催化邻苯二酚和 L-多巴氧化反应均遵循 Michaelis-Menten 双曲线方程式，求得5龄幼虫多酚氧化酶的米氏常数(K_m)。将以同样的实验方法测得不同虫态及虫龄的多酚氧化酶催化邻苯二酚和 L-多巴氧化反应的米氏常数(K_m)结果列于表 1。

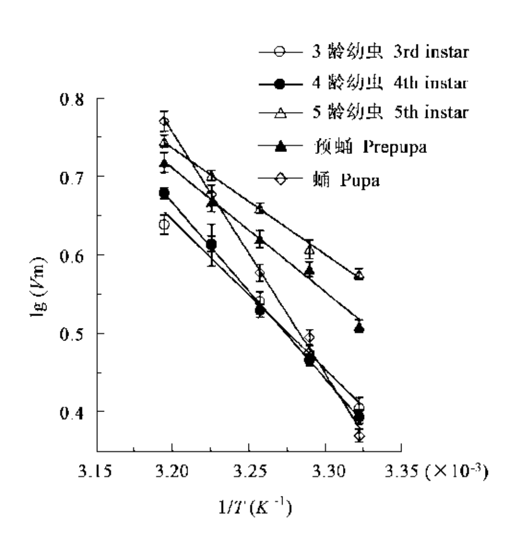
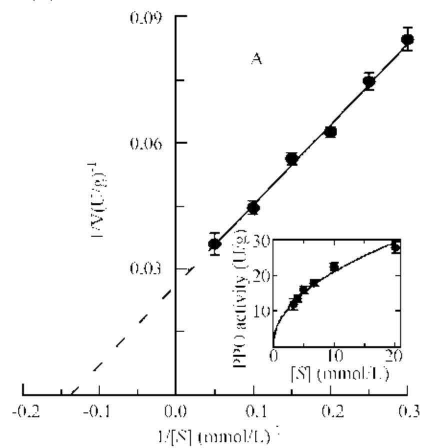


图4 菜青虫不同虫态及虫龄多酚氧化酶催化邻苯二酚 Arrhenius 关系图

Fig. 4 Arrhenius plots for the oxidation of catechol by polyphenoloxidase from different stages and instars of *Pieris rapae*

3 讨论

多酚氧化酶是含有一个双铜核的氧化酶，可以将单酚(monophenols)氧化成二酚，并进一步将二酚氧化成醌。由多酚氧化酶催化生成的醌和二醌是昆虫表皮硬化和黑化的初始产物。通常，昆虫一进入变态，其血液中的多酚氧化酶活性即增强，这可能是表皮的激活剂受到蜕皮激素的作用而活化的关系，表皮中的多酚氧化酶在蛹形成或行将蜕皮时活性增强，随后便降低。本研究得出菜青虫多酚氧化酶的活力与不同虫态及虫龄有密切关系。在幼虫期多酚氧化酶活力随虫龄增加酶活力增大，这与马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus* 多酚氧化酶的研究结果基本一致(李周直，1993；陈尚文和杨振德，1996)；与不同龄期斯氏按蚊 *Anopheles stephensi*(时超美等，2000)和不同日龄埃及伊蚊 *Aedes aegypti*(Li *et al*., 1992)中多酚氧化酶活性变化随蚊龄增加酶活力反而降低的结果相反。昆虫中的多酚氧化酶一般以无活性的酚氧化酶原(prophenoloxidase)的形式存在于血液和体壁内。这种酶原的活化方式大致有以下几种：(1)酶自身的催化作用；(2)酶亚单位的聚集；(3)由某种活性物质分解部分酶原蛋白而使其活化。活性物质包括：(1)唾腺的分泌物；(2)体壁中的脂质；(3)表皮中的一种蛋白质。酚氧化酶原的活化也可由激活剂以外的因素促成。另外，本研究采用的材料是幼虫及蛹的整体匀浆，其血液和表皮均包含在内，故其活性



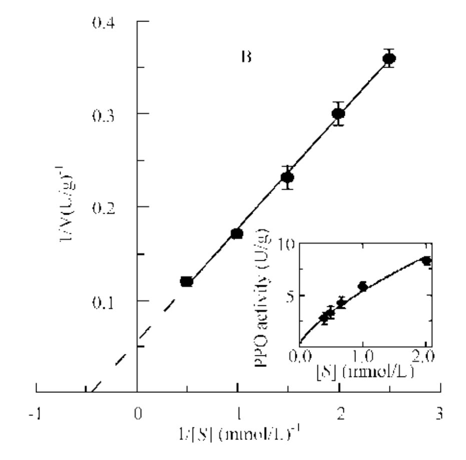


图5 以邻苯二酚(A)和L-多巴(B)为底物对菜青虫5龄幼虫多酚氧化酶的 Lineweaver-Burk 双倒数作图

Fig. 5 Lineweaver-Burk plots for the oxidation of catechol (A) and L-DOPA (B) by polyphenoloxidase from the 5th instar of *Pieris rapae*

表1 菜青虫不同虫态及虫龄多酚氧化酶的性质

Table 1 Properties of polyphenoloxidase from *Pieris rapae* in different stages and instars of *Pieris rapae*

虫态及龄期 Stage and instar	最适温度(℃)(± *SE*) Optimum temperature	最适 pH(± *SE*) Optimum pH	K_m(mmol/L)(± *SE*) 邻苯二酚 Catechol	K_m(mmol/L)(± *SE*) L-多巴 L-DOPA	活化能 E_a(± *SE*) (kJ/mol)
幼虫 Larva					
3 龄 3rd instar	36.0±0.5	7.0±0.2	7.86±0.09	2.13±0.02	43.10±0.28
4 龄 4th instar	38.5±1.0	7.0±0.2	7.83±0.06	2.11±0.03	36.50±0.27
5 龄 5th instar	43.0±1.0	7.0±0.2	7.25±0.07	2.09±0.02	25.79±0.32
预蛹 Prepupa	45.5±1.0	7.0±0.2	7.56±0.08	2.10±0.03	30.10±0.21
蛹 Pupa	50.0±1.5	7.0±0.2	18.11±.09	3.43±0.03	58.88±0.39

是血液和表皮多酚氧化酶的综合活性。

我们以邻苯二酚为底物，研究得出 pH 对菜青虫不同虫态及虫龄多酚氧化酶活力的影响无明显差别，最适 pH 均为 7.0 ± 0.2。不同虫期多酚氧化酶催化底物氧化反应的最适温度研究结果表明，菜青虫不同虫态及虫龄多酚氧化酶的最适温度有很大的差异，幼虫期多酚氧化酶活力的最适温度较低，且最适温度随龄期减小而降低，以蛹期多酚氧化酶活力的最适温度最高。蛹作为菜青虫越冬和越夏的虫态，较高的适宜温度与其体内蛋白质等的合理调节和对外界环境的适应性有关。此研究结果与白对虾多酚氧化酶活力的最适温度（40℃）（Benjamin and Maurice，1998）和龙虾 *Panulirus stimpsoni* 多酚氧化酶活力的最适温度（37℃）（夏栋和卞疆，2000）研究结果有相同之处。进一步比较它们催化底物氧化反应的活化能，结果表明，5 龄幼虫多酚氧化酶催化底物（邻苯二酚）氧化的活化能最低（25.79 ± 0.32 kJ/mol），而蛹期最高（58.88 ± 0.39 kJ/mol），两者比值高达 2.28 倍。5 龄幼虫多酚氧化酶活力（22.57 ± 0.35 U/g）是蛹期酶活力（8.36 ± 0.14 U/g）的 2.69 倍。在昆虫生长发育过程中进行醌鞣化时，体内的 N-乙酰儿茶酚胺将在多酚氧化酶的催化下形成 O-醌，此时昆虫表皮蛋白质通过同醌交联，从而使表皮变为坚硬、暗化；同时离体实验表明，当蛋白质过剩时，结合的物质即以还原态的邻苯二酚形式出现，且颜色较浅；当形成的醌过量时，结合后的物质处于氧化状态，产物的颜色较深（王荫长，2001）。5 龄幼虫作为菜青虫幼虫期的最后一个龄期，即将进入变态，其体内酶活力最高，以便为其自身变态后表皮硬化和黑化进行准备；预蛹期酶活力较 5 龄幼虫低，可能是因其体内部分多酚氧化酶参与了催化 N-乙酰儿茶酚胺的反应；至蛹期时，菜青虫已完成变态，完成了硬化和黑化，因而酶活力随之降低。实验中测得幼虫酶活力 3 龄 < 4 龄 < 5 龄，应该认为是菜青虫在发育过程中 3 龄幼虫较 4 龄幼虫表现幼嫩、色淡，4 龄幼虫较 5 龄幼虫幼嫩、色淡的原因之一。

不同虫态及虫龄多酚氧化酶对底物邻苯二酚和 L-多巴的亲和力有显著的差异，不同虫态及虫龄的多酚氧化酶对底物作用的米氏常数（K_m）测定结果（表 1）表明，以 5 龄幼虫的 K_m 最小，蛹的 K_m 最大，其亲和力强弱顺序为：5 龄幼虫 > 预蛹 > 4 龄幼虫 > 3 龄幼虫 > 蛹。以上这些实验结果很吻合，都显示了菜青虫随着虫龄的增加，多酚氧化酶活力增强，亲和力提高，反应的活化能下降。菜青虫多酚氧化酶的这些基本酶学特征，为进一步探讨其不同虫态及虫龄多酚氧化酶的性质差异，也为开发以该酶为靶标的新型杀虫剂提供了理论依据。

参 考 文 献（References）

Ashida M，Yamazaki H，1990. Biochemistry of the phenoloxidase system in insect：with special reference to its activation. In：Ohnishi E，Ishizaki H eds. Molting and Metamorphosis. Tokyo：Japan Science Society Press. 239 – 261.

Benjamin KS，Maurice RM，1998. Phenoloxidases from pink and white shrimp：kinetic and other properties. *Journal and Food Biochemistry*，12：205 – 217.

Benjamin ND，Montgomery MW，1973. Polyphenoloxidase of Royal Ann cherries：purification and characterization. *J. Food Sci.*，38：799 – 806.

Boman HG，Faye I，Gudmundsso GH，Lee JY，Lidholm DA，1991. Cell-free immunity in Cecropia. A model system for antibacterial proteins. *Eur. J. Biochem.*，201：23 – 31.

Chen QX，Kubo I，2002. Inhibition kinetics of tyrosinase by quercetin. *J. Agric. Food Chem.*，50：4 108 – 4 112.

Chen SW，Yang ZD，1996. Activities of polyphenol oxidase in *Dendrolimus punctatus* and *Tessaratoma popillosa*. *Guangxi Sciences*，3（2）：45 – 50.［陈尚文，杨振德，1996. 马尾松毛虫和荔蝽体内多酚氧化酶的初步研究. 广西科学，3（2）：45 – 50］

Li J，Tracy JW，Christensen BM，1992. Relationship of the hemolymph phenoloxidase and mosquito age in *Aedes aegypti*. *J. Invertebr. Pathol.*，60：188 – 191.

Li ZZ，1993. Correlation of protein，nuclease and carboxylesterase with pesticide resistance in massonpine caterpillar. *Acta Entomol. Sin.*，36（3）：296 – 301.［李周直，1993. 马尾松毛虫蛋白质、核酸酶和羧酸酯酶与耐药性的关系. 昆虫学报，36（3）：296 – 301］

Shi CM，Huang FS，Kuang MS，Duan JH，2000. Relationship between hemolymph phenol oxidase and melanization of oocysts of *Plasmodium yoelii* in *Anopheles stephensi*. *Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases*，18（1）：11 – 13.［时超美，黄复生，况明书，段建华，2000. 斯氏按蚊血淋巴酚氧化酶与约氏疟原虫卵囊黑化的关系. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，18（1）：11 – 13］

Wang YC，2001. Insect Biochemistry. Beijing：China Agriculture Press. 129 – 130.［王荫长，2001. 昆虫生物化学. 北京：中国农业出版社. 129 – 130］

Xia D，Bian J，2000. Purification and kinetic properties of polyphenoloxidase from *Panulirus stimpsoni*. *Jiangsu Shipin yu Fajiao*，（1）：16 – 19.［夏栋，卞疆，2000. 龙虾多酚氧化酶的纯化及其部分生化特性. 江苏食品与发酵，（1）：16 – 19］

Zhang ZB，Leng XF，1993. Pesticide Toxicology and Application. Beijing：Chemistry and Factory Press. 331 – 337.［张宗炳，冷欣夫，1993. 杀虫药剂毒理及应用. 北京：化学工业出版社. 331 – 337］

Zhang Z，Zhao H，Zhou XW，Chen LF，Chen TS，Chen QX，1999. Priliminary studies on isolation，purification and some properties of（β-glucosidase from *Ampullarium crossean*. *Journal of Xiamen University*（*Natural Science*），38（2）：287 – 291.［张喆，赵红，周兴旺，陈兰芬，陈天圣，陈清西，1999. 福寿螺β-葡萄糖苷酶的分离纯化及性质的初步研究. 厦门大学学报（自然科学版），38（2）：287 – 291］

（责任编辑：黄玲巧）